

На правах рукописи

КИПЕНКО
АННА ВИКТОРОВНА

РОЛЬ Na^+ , K^+ -АТФазы В РЕГУЛЯЦИИ РОСТА ТКАНИ ПЕЧЕНИ И СЕРДЦА

03.00.13 – физиология
03.00.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2009

Работа выполнена в лаборатории физиологии возбудимых мембран Института физиологии им. И.П. Павлова РАН

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор
Крылов Борис Владимирович

доктор медицинских наук, профессор
Лобов Геннадий Иванович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Любашина Ольга Анатольевна
Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН

доктор биологических наук, профессор
Крутецкая Зоя Иринарховна
Санкт-Петербургский государственный университет

Ведущая организация: Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН

Защита состоится «10» декабря 2009 года в 13 часов на заседании Диссертационного совета (Д 002.020.01) по защите докторских и кандидатских диссертаций при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН (199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Автореферат разослан «10» ноября 2009 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
доктор биологических наук

Н.Э. Ордян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Одной из ключевых задач биологии клетки является изучение тонких механизмов передачи и усиления сигналов. Их знание необходимо для понимания функционального ответа клеток в норме и его коррекции при патологических состояниях. В последнее десятилетие особый интерес исследователей вызывает участие Na^+, K^+ -АТФазы в процессах внутриклеточной сигнализации, то есть ее роль в организации ответа клетки на различные физиологические стимулы (Xie, Askari, 2002; Schoner, Scheiner-Bobis, 2005; Aperia, 2007; Liang et al., 2007).

Функции, которые выполняет Na^+, K^+ -АТФаза можно разделить на две большие группы: 1) насосная функция, связанная с переносом одновалентных катионов и процессами, зависимыми от величины градиентов концентрации ионов по обе стороны плазматической мембраны, 2) сигнальная функция, в этом случае Na^+, K^+ -АТФаза выступает как трансдуктор сигнала.

В культуре клеток разного типа показано, что Na^+, K^+ -АТФаза в качестве трансдуктора сигнала запускает внутриклеточные сигнальные каскады, вызывает изменение экспрессии некоторых генов (Kometiani et al., 1998; Xie et al., 1999), внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} (Aizman et al., 2001; Zhang et al., 2006; Liu et al., 2007) и активных форм кислорода (Liu et al., 2000; Xie, Askari, 2002). Na^+, K^+ -АТФаза в качестве трансдуктора сигнала модулирует рост клеток (Haas et al., 2002; Wang et al., 2004; Schoner, 2005; Manunta, Ferrandi, 2006; Tian et al., 2006), апоптоз (Brodie et al., 1995; Huang et al., 2004; Schoner, Scheiner-Bobis, 2007), клеточную адгезию и подвижность (Barwe et al., 2005; Larre et al., 2006; Aperia, 2007).

В сенсорных нейронах млекопитающих фермент в качестве трансдуктора участвует в передаче сигналов от опиоидоподобных рецепторов к медленным натриевым каналам $\text{Na}_v1.8$ (Крылов и др., 1999).

Сигнальная функция Na^+, K^+ -АТФазы регулируется низкими дозами сердечных гликозидов, недостаточными для ингибирования ионной помпы (Xie, Askari, 2002; Xie, 2003; Schoner, Scheiner-Bobis, 2007). Сердечные гликозиды (оубаин, дигоксин, строфантин К), получаемые из растений, долгое время использовали и как инструмент для изучения насосной функции Na^+, K^+ -АТФазы. Дигоксин и строфантин К применяют для лечения хронической сердечной недостаточности. В 1990-х годах было обнаружено, что некоторые сердечные гликозиды синтезируются в гипоталамусе (оубаин) и коре надпочечников млекопитающих (оубаин, дигоксин, Маринобуфогенин) и выделяются в кровь в концентрациях, сопоставимых с дозами, модулирующими трансдукторную функцию Na^+, K^+ -АТФазы *in vitro* (Schoner, 2002; Hamlyn, 2004). Однако, физиологическая

роль эндогенных дигиталисоподобных факторов остается малоизученной. Тот факт, что сердечные гликозиды влияют как на насосную, так и на сигнальную функцию Na^+, K^+ -АТФазы, привел к формированию представления об этой мембранной структуре как о мишени для эндогенных сердечных гликозидов (Schoner, Scheiner-Bobis, 2007). Сайт связывания сердечных гликозидов находится на внеклеточной стороне α -субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы (Bagrov et al., 2009). Однако, во всех исследованиях, посвященных изучению взаимодействия Na^+, K^+ -АТФазы с дигиталисоподобными факторами использовались высокие концентрации последних. Таким образом, известные участки взаимодействия фермента с этими специфическими лигандами вовлечены в регуляцию насосной функции Na^+, K^+ -АТФазы. Сайт связывания сердечных гликозидов, активирующий передачу сигнала от поверхностной мембраны к внутриклеточным или мембранным эффекторам, не идентифицирован. Кроме того, неясно, какие изоформы каталитической субъединицы фермента участвуют в реализации сигнальной функции Na^+, K^+ -АТФазы.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы являлось изучение роли Na^+, K^+ -АТФазы в регуляции роста ткани печени и сердца. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать влияние селективных ингибиторов Na^+, K^+ -АТФазы оубаина, строфантина К, дигоксина и оубагенина на рост эксплантатов ткани печени и сердца 10-12-дневных куриных эмбрионов.
2. Теоретически и экспериментально оценить возможность образования молекулой оубаина хелатных комплексов с ионами Ca^{2+} и участие этого комплекса в модуляции сигнальной функции Na^+, K^+ -АТФазы.
3. Исследовать влияние и выявить возможный механизм действия коеновой кислоты на ткань печени и сердца 10-12-дневных куриных эмбрионов в органотипической культуре.
4. Исследовать состояние антитоксической функции печени, параметров систолического давления и ЭКГ взрослых крыс в условиях хронического 90-дневного внутривенного введения препарата «Аноцептин», действующей субстанцией которого является коеновая кислота.

Научная новизна результатов исследования. Для изучения сигнальной функции Na^+, K^+ -АТФазы впервые был использован метод органотипической культуры ткани печени и сердца. Впервые экспериментально доказано участие Na^+, K^+ -АТФазы как трансдуктора сигнала в регуляции роста ткани сердца в эмбриональный период онтогенеза. Впервые показано тканеспецифичное действие оубаина, строфантина К и

дигоксина, которое проявляется в механизме взаимодействия производных 1,2-циклопергидропентафенантрена с различными изоформами α -субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы. Теоретически доказана возможность образования молекулой оубаина хелатных комплексов с ионами Ca^{2+} . Впервые обнаружено, что хелатор ионов кальция ЭГТА (10^{-3} М) устраняет разнонаправленные эффекты оубаина в отношении регуляции роста эксплантатов ткани сердца. Это свидетельствует о том, что комплекс Na^+, K^+ -АТФаза–оубаин– Ca^{2+} может служить стимулом для активации трансдукторной функции Na^+, K^+ -АТФазы. $\alpha 3$ -изоформа фермента, чувствительная к низким, сопоставимым с эндогенными, концентрациям оубаина, участвует в регуляции роста ткани сердца в эмбриональный период онтогенеза. Впервые показано, что действие оубаина на рост ткани печени, в которой экспрессируется только $\alpha 1$ -изоформа Na^+, K^+ -АТФазы, не связано с трансдукторной функцией фермента. Впервые обнаружено, что регулирующее рост ткани печени и сердца действие агликона оубаина оубагенина не является тканеспецифичным. По-видимому, рамнозильный остаток молекулы оубаина повышает эффективность взаимодействия гликозида с трансдукторным сайтом Na^+, K^+ -АТФазы кардиомиоцитов. Впервые показано, что коеновая кислота не влияет на пролиферацию гепатоцитов и дозозависимо модулирует рост эксплантатов ткани сердца. Отсутствие влияния препарата «Аноцептин», действующей субстанцией которого является коеновая кислота, на электрические процессы в миокарде доказывает, что действие препарата не затрагивает электрогенную функцию Na^+, K^+ -АТФазы кардиомиоцитов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Na^+, K^+ -АТФаза участвует в модуляции роста ткани печени и сердца.
2. $\alpha 1$ -изоформа Na^+, K^+ -АТФазы выполняет в гепатоцитах печени только насосную функцию.
3. Сигнальная функция Na^+, K^+ -АТФазы в ткани сердца, по-видимому, зависит от присутствия свободных ионов Ca^{2+} во внеклеточной среде и реализуется через активацию $\alpha 3$ -изоформы каталитической субъединицы фермента.
4. Вероятно, способность оубаина модулировать трансдукторную функцию Na^+, K^+ -АТФазы связана с возможностью образовывать хелатные комплексы с ионами Ca^{2+} в различных конформациях и наличием в его молекуле рамнозильного остатка.
5. Коеновая кислота не влияет на пролиферацию гепатоцитов и дозозависимо модулирует рост эксплантатов ткани сердца 10-12-дневных куриных эмбрионов. Препарат «Аноцептин», действующей субстанцией которого является коеновая кислота, в условиях хронического 90-дневного внутривенного введения не влияет на антиоксидантные свойства печени, состояние сердечно-сосудистой системы

взрослых животных и не затрагивает электрогенную функцию Na^+, K^+ -АТФазы мембраны кардиомиоцитов.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные экспериментальные данные вносят вклад в понимание физиологической роли трансдукторной функции Na^+, K^+ -АТФазы. Работа расширяет представления о роли эндогенных дигиталисоподобных факторов в регуляции пролиферации клеток различных тканей. Анализ полученных результатов позволил сформулировать гипотезу о механизме модуляции эндогенным оубаином трансдукторной и насосной функций Na^+, K^+ -АТФазы. Сочетание квантово-химических расчетов и экспериментальных данных позволило оценить вклад ионов Ca^{2+} и рамнозильного остатка в способность оубаина модулировать трансдукторную функцию Na^+, K^+ -АТФазы. Экспериментально доказано, что лекарственный препарат «Аноцептин» не вызывает структурных изменений ткани печени, не влияет на ее антитоксическую функцию и не оказывает негативного влияния на состояние сердечно-сосудистой системы при хроническом введении взрослым крысам. Последнее позволяет рекомендовать назначать аноцептин пациентам с нарушенными функциями печени и сердечно-сосудистой патологией.

Материалы диссертации использованы в курсах лекций «Общая физиология» и «Нервно-мышечная физиология» на кафедре общей физиологии биолого-почвенного факультета СПбГУ; в курсе лекций и практических занятиях в разделах «Физиология возбудимых тканей» и «Физиология рецепторов, нервов и синапсов» на кафедре нормальной физиологии ГОУВПО СПбГМА им. И.И. Мечникова Росздрава; в научно-клинической работе Института Мозга человека РАН; в научно-инновационной работе Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Апробация работы. Основные материалы диссертации доложены и обсуждены на VI Всероссийской университетской научно-практической конференции молодых ученых и студентов по медицине (Тула, 2007), Всероссийском форуме студентов, аспирантов и молодых ученых «Наука и инновации в технических университетах» (Санкт-Петербург, 2007), 2-ой Санкт-Петербургской конференции фонда А. Гумбольдта: «Технологии 21-го века: биологические, физические, информационные и социальные аспекты» (Санкт-Петербург, 2008), втором Всероссийском форуме студентов, аспирантов и молодых ученых «Наука и инновации в технических университетах» (Санкт-Петербург, 2008), II Съезде физиологов СНГ (Кишинэу (Молдова), 2008), Политехническом симпозиуме: «Молодые ученые – промышленности Северо-Западного региона» (Санкт-Петербург, 2008), 7-ой международной научно-практической конференции «Исследование, разработка и применение высоких технологий в промышленности» [Высокие технологии,

фундаментальные и прикладные исследования, образование] (Санкт-Петербург, 2009), Политехническом симпозиуме: «Молодые ученые – промышленности Северо-Западного региона» (Санкт-Петербург, 2009), VII Всероссийской конференции с международным участием «Механизмы функционирования висцеральных систем» (Санкт-Петербург, 2009). По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 2 статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследований, обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 141 странице машинописного текста, содержит 20 рисунков и 3 таблицы. Список литературы включает 237 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Метод органотипической культуры. Для исследования трофических свойств оуабаина (Sigma, США), оуабагенина (Sigma, США), строфантина К (Россия), дигоксина (Россия) и коеновой кислоты (Россия), а также для оценки возможного механизма влияния этих веществ на сигнальную функцию Na^+, K^+ -АТФазы применяли метод органотипической культуры ткани печени и сердца. В части экспериментов использовали хелатор ионов кальция ЭГТА (Sigma, США). Эксперименты осуществляли на 10-12-дневных куриных эмбрионах. Исследования выполнены на 1500 эксплантатах, культивируемых в чашках Петри с коллагеновым покрытием дна. Эксплантаты культивировали в питательной среде в течение 3 суток в CO_2 -инкубаторе (Sanyo, Япония) при температуре 37°C и 5% содержании CO_2 . Контрольные эксплантаты культивировали в питательной среде стандартного состава (Лопатина и др., 2005; Кипенко и др., 2009). В экспериментальных чашках в культуральную среду добавляли исследуемые вещества в различных концентрациях. Количественную оценку влияния исследуемых веществ на рост эксплантатов ткани печени и сердца осуществляли с помощью морфометрического метода. Интенсивность роста эксплантатов оценивали по величине индекса площади (ИП), рассчитывая его как отношение площади всего эксплантата, включая периферическую зону роста, к площади исходного фрагмента ткани. За условную единицу площади принимали квадрат морфометрической сетки окуляра микроскопа. Сторона квадрата при увеличении 3.5×10 равна 150 мкм. Величину ИП выражали в процентах, контрольное значение ИП принимали за 100%. В каждой серии опытов "n" - количество культивируемых эксплантатов. Для визуализации использовали микротеленасадку для микроскопа (серия 10, МТН-13 «Альфа телеком», Россия). Количественную оценку роста эксплантатов ткани печени осуществляли с помощью программы «Photo M 1.2».

Методы квантовохимического анализа. Полную оптимизацию геометрических параметров возможных конформаций комплекса оуабаина с Ca^{2+} проводили методом *ab initio* с применением базиса 6-31G* в рамках программного комплекса GAMESS (Schmidt et al., 1993). Расчеты осуществляли в приближении газовой фазы.

Гистологические методы исследования. Рост эксплантатов ткани печени и сердца исследовали прижизненно с помощью светового микроскопа и на гистологических препаратах. Для приготовления последних кусочки тканей культивировали на покровных стеклах, помещенных в чашки Петри. Через 3-е суток стекла с прикрепленными эксплантатами фиксировали 70° этанолом, перед окраской ополаскивали дистиллированной водой. Препараты окрашивали свежеприготовленным раствором гематоксилина Вейгерта (BioVitrum) 3 минуты. Затем стекла ополаскивали в 2-х сменах водопроводной воды по 30 с. Для докраски цитоплазмы использовали 0,5 % спиртовой раствор эозина (BioVitrum), после чего стекла ополаскивали в 96° этаноле. Препараты просветляли в ксилоле (Aldrich) 20–30 с и заключали в полистирол (Sigma) (Меркулов, 1969), фотографировали при помощи установки, включающей в себя микроскоп LSM 710 Carl Zeiss (Германия), цифровую фотокамеру Axio Cam HRm Zeiss и персональный компьютер с пакетом программ для обработки изображений.

Хронические эксперименты *in vivo*. Эксперименты проводили на белых крысах линии Вистар обоего пола. Исследования выполнены на 160 животных из них 40 животных обоего пола составили контрольную группу.

Влияние коеновой кислоты на антитоксическую функцию печени определяли в условиях **гексеналового сна** (Хабриев, 2005). Продолжительность наркотического (гексеналового) сна отражает степень восстановления микросомальных ферментов клеток печени, метаболизирующих лекарственные препараты. Аноцептин (Россия) вводили ежедневно однократно внутривенно в течение 90 дней в дозах 5, 100 и 300 мг/кг (в пересчете на действующую субстанцию коеновую кислоту). Продолжительность гексеналового сна выражали в минутах от момента наступления наркоза (переход в боковое положение тела) до выхода из наркоза (переворачивание). Продолжительность гексеналового сна оценивали в фоне, на 30-й и 90-й дни от начала исследования. Через 6 и 12 часов после инъекции аноцептина, крысам экспериментальных групп внутрибрюшинно вводили раствор гексенала в дозе 90 мг/кг, в качестве растворителя использовали 0.9% раствор NaCl. Животным контрольной группы вместо аноцептина вводили 0.9% раствор NaCl.

Для оценки влияния аноцептина в дозах 5, 100 и 300 мг/кг (в пересчете на действующую субстанцию коеновую кислоту) на состояние сердечно-сосудистой

системы и насосную функцию Na^+, K^+ -АТФазы мембраны кардиомиоцитов проводили **регистрацию систолического давления и электрокардиографическое исследование**. Эксперименты проводили на ненаркотизированных крысах (Хабриев, 2005). Аноцептин вводили по схеме, описанной выше. Для измерения систолического давления (СД) и регистрации электрокардиограммы (ЭКГ) крыс помещали в специальные пеналы. Для регистрации СД использовали пьезоэлектрический датчик («Регистратор артериального давления», Италия), закрепленный на хвосте крысы с помощью манжетки соответствующего размера. Запись ЭКГ осуществляли на полиграфе RM-6000 (Япония) во 2-ом стандартном отведении после стабилизации показателей. Показатели работы сердечно-сосудистой системы измеряли непосредственно после введения препарата, на 30-й и 90-й дни исследования.

Статистические методы обработки полученных результатов. Статистическую обработку данных производили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Результаты представлены в виде средних значений и их стандартных отклонений ($M \pm m$), а также в процентах от значений в контрольных группах. Достоверными считали отличия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Исследование влияния селективного ингибитора Na^+, K^+ -АТФазы оуабаина на рост эксплантатов ткани печени и сердца 10-12-дневных куриных эмбрионов

Влияние оуабаина на рост ткани печени было исследовано в диапазоне концентраций $1 \cdot 10^{-4}$ - $1 \cdot 10^{-10}$ М. Рост эксплантатов при введении в питательную среду ингибитора в концентрациях $1 \cdot 10^{-4}$ - $5 \cdot 10^{-7}$ М практически отсутствовал. При концентрации оуабаина $2 \cdot 10^{-7}$ М ИП эксплантатов был ниже контрольного значения ($n=27$) на $74 \pm 2\%$ ($n=25$, $p < 0.05$), а при концентрации $1 \cdot 10^{-7}$ М ИП был на $40 \pm 5\%$ ($n=27$, $p < 0.05$) меньше по сравнению с контролем ($n=27$). В концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ М уменьшение ИП экспериментальных эксплантатов составило $23 \pm 2\%$ ($n=26$, $p < 0.05$) по отношению к контролю ($n=25$). Дальнейшее снижение концентрации ингибитора не влияло на рост эксплантатов ткани печени, ИП не отличался от контрольного значения. Для того, чтобы оценить K_D (константу диссоциации) реакции блокирования Na^+, K^+ -АТФазы оуабаином, использовали уравнение Хилла. Расчеты показали, что величина K_D составила $1 \cdot 10^{-7}$ М, а коэффициент Хилла был равен 0,5.

При исследовании действия оуабаина на рост эксплантатов ткани сердца, гликозид вводили в питательную среду в диапазоне концентраций $1 \cdot 10^{-8}$ - $1 \cdot 10^{-13}$ М. В концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ М он полностью угнетал рост, в концентрации $1 \cdot 10^{-9}$ М недостоверно стимулировал рост эксплантатов. При введении в питательную среду оуабаина в

концентрации $1 \cdot 10^{-10}$ М наблюдали достоверный стимулирующий рост эффект. ИП эксплантатов был выше контрольного значения ($n=25$) на $33 \pm 3\%$ ($n=26$, $p < 0.05$). В концентрациях $1 \cdot 10^{-11}$ - $1 \cdot 10^{-13}$ М гликозид не влиял на рост ткани сердца, ИП не отличался от контрольного значения.

2. Изучение действия строфантина К и дигоксина на рост эксплантатов ткани печени и сердца 10-12-дневных куриных эмбрионов

Влияние указанных сердечных гликозидов на рост ткани печени изучено в диапазоне концентраций от $1 \cdot 10^{-6}$ до $1 \cdot 10^{-11}$ М. Строфантин К ($1 \cdot 10^{-6}$ М) и дигоксин ($1 \cdot 10^{-7}$ М) полностью блокировали рост эксплантатов. При введении в питательную среду строфантина К ($1 \cdot 10^{-7}$ М) или дигоксина ($1 \cdot 10^{-8}$ М) наблюдали достоверное ингибирование роста эксплантатов ткани печени и ИП был на $45 \pm 5\%$ ($n=25$, $p < 0.05$) ниже контрольного значения. Добавление в культуральную среду строфантина К в концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ М достоверно уменьшало величину ИП эксплантатов на $29 \pm 3\%$ ($n=27$, $p < 0.05$) по сравнению с контролем ($n=25$). Дальнейшее снижение концентрации сердечных гликозидов на рост ткани печени влияло незначительно, ИП не претерпевал достоверных отличий от контрольных значений.

В следующей серии экспериментов было исследовано действие низких доз строфантина К ($1 \cdot 10^{-11}$ - $1 \cdot 10^{-14}$ М) и дигоксина ($1 \cdot 10^{-14}$ - $1 \cdot 10^{-16}$ М) на рост ткани сердца в органотипической культуре. В концентрации $1 \cdot 10^{-14}$ М дигоксин полностью угнетал рост эксплантатов. При добавлении в питательную среду строфантина К в концентрации $1 \cdot 10^{-11}$ М ИП эксплантатов был на $26 \pm 3\%$ ($n=25$, $p < 0.05$) ниже контрольного ($n=25$). Строфантин К в концентрациях $1 \cdot 10^{-12}$ - $1 \cdot 10^{-14}$ М и дигоксин в концентрациях $1 \cdot 10^{-15}$ - $1 \cdot 10^{-16}$ М на рост экспериментальных эксплантатов практически не влияли, ИП незначительно отличался от контроля.

3. Оценка влияния оуабагенина на рост ткани печени и сердца 10-12-дневных куриных эмбрионов

Молекулы исследованных гликозидов оуабаина, строфантина К и дигоксина характеризуются сходным строением стероидного кольца (агликона) и различным количеством сахарных остатков (гликонов), входящих в состав их молекул. Обнаруженное тканеспецифическое действие гликозидов на рост ткани печени и сердца, а также различные действующие концентрации последних позволили предположить, что остатки сахаров вносят свой вклад во взаимодействие молекулы гликозида с трансдукторным сайтом Na^+ , K^+ -АТФазы. Для проверки этой гипотезы было исследовано влияние агликона оуабаина – оуабагенина на рост эксплантатов ткани печени и сердца.

Влияние оуабанина на рост ткани печени и сердца было исследовано в диапазоне концентраций $1 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-9}$ М. В концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ М стероид практически полностью угнетал рост ткани печени. В этой же концентрации оуабанин достоверно ингибировал рост эксплантатов ткани сердца, ИП был на $71 \pm 3\%$ ($n=25$, $p < 0.05$) ниже по отношению к контролю ($n=26$). Добавление в питательную среду оуабанина в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М достоверно угнетало рост исследуемых тканей в среднем на $45 \pm 5\%$ ($n=26$, $p < 0.05$) по сравнению с контролем ($n=26$). Действие препарата носило дозозависимый, но не тканеспецифичный характер.

4. Теоретическая и экспериментальная оценка возможности образования молекулой оуабанина хелатных комплексов с ионами Ca^{2+} и участия этого комплекса в модуляции сигнальной функции Na^+ , K^+ -АТФазы

Оуабанин в различных концентрациях модулирует как насосную, так и сигнальную функцию Na^+ , K^+ -АТФазы. Этот факт свидетельствует о существовании механизма специфического лиганд-рецепторного взаимодействия оуабанина с некоторыми аминокислотами в составе α -субъединицы. Конформационные изменения, возникающие в ходе этого взаимодействия, регулируют либо функцию помпы, либо сигнальную функцию Na^+ , K^+ -АТФазы. Данные систематического квантовохимического анализа поверхности потенциальной энергии системы оуабанин– Ca^{2+} позволили выявить возможные конформации хелатных комплексов. Существует два принципиально различных способа хелатирования иона Ca^{2+} молекулой оуабанина. В первом случае Ca^{2+} образует координационные связи с пятью атомами кислорода O^1 , O^3 , O^5 , O^{19} и $\text{O}^{5'}$ (рис. 1а): длины связей Ca–O составляют 2.34–2.49 Å, заряд на атоме кальция $q(\text{Ca}) = 1.56$ а.е., кольцо А ($\text{C}^1\text{C}^2\text{C}^3\text{C}^4\text{C}^5\text{C}^{10}$) принимает конформацию кресла. Во втором случае ион Ca^{2+} связан с тремя атомами кислорода O^1 , O^{11} и O^{19} (рис. 1б): величины расстояний Ca–O лежат в диапазоне 2.28–2.48 Å, $q(\text{Ca}) = 1.67$ – 1.69 а.е., при этом кольцо А может находиться как в конформации кресла, так и в конформации ванны. Энтальпийные эффекты хелатирования составляют в первом случае ~ -170 ккал/моль, во втором случае – ~ -130 и ~ -140 ккал/моль (кольцо А находится в конформации кресла и ванны соответственно). Геометрия комплекса оуабанин– Ca^{2+} существенно отличается от пространственного строения свободной молекулы оуабанина.

Предположение об участии хелатных комплексов оуабанин– Ca^{2+} в модуляции сигнальной функции Na^+ , K^+ -АТФазы исследовали экспериментально. В первой серии

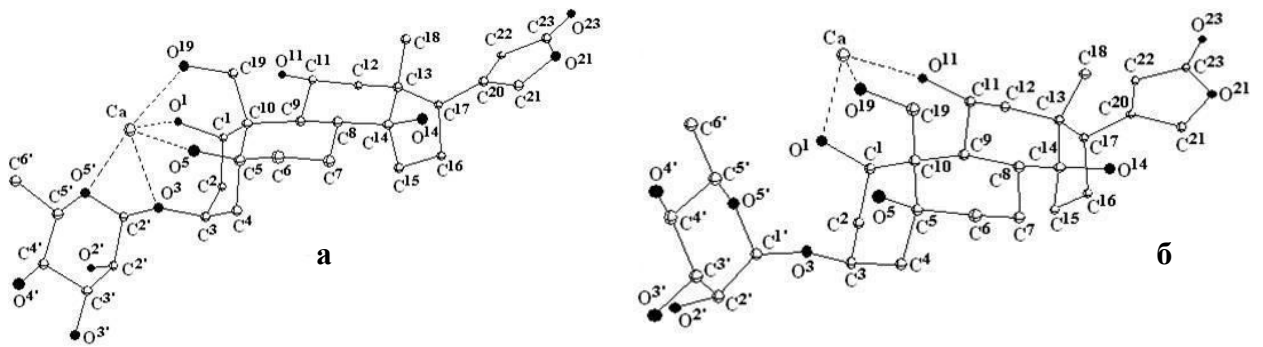


Рис. 1. Пространственное строение возможных конформаций комплекса оубаина- Ca^{2+} . Координационные связи Ca-O обозначены пунктирными линиями. Атомы водорода не приведены.

экспериментов исследовали влияние хелатора ионов Ca^{2+} ЭГТА на рост эксплантатов ткани печени и сердца ЭГТА исследован в диапазоне концентраций от $1 \cdot 10^{-2}$ до $1 \cdot 10^{-6}$ М. Действие препарата имело дозозависимый, но не тканеспецифичный характер. В концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ М ЭГТА достоверно ингибировал рост исследуемых тканей в среднем на 50% по сравнению с контролем. При сочетанном введении оубаина ($1 \cdot 10^{-6}$) и ЭГТА ($1 \cdot 10^{-3}$ М) наблюдали полное ингибирование роста эксплантатов ткани печени (рис. 2а). При действии оубаина на эксплантаты ткани сердца ($1 \cdot 10^{-8}$ (рис. 2в)/ $1 \cdot 10^{-10}$ М (рис. 2г)) на фоне ЭГТА ($1 \cdot 10^{-3}$ М) наблюдали снятие ингибирующего/стимулирующего действия оубаина, ИП экспериментальных эксплантатов не отличался от контрольного значения. По-видимому, разнонаправленные эффекты оубаина в отношении регуляции пролиферации кардиомиоцитов связаны с его способностью образовывать хелатные комплексы в различных конформациях.

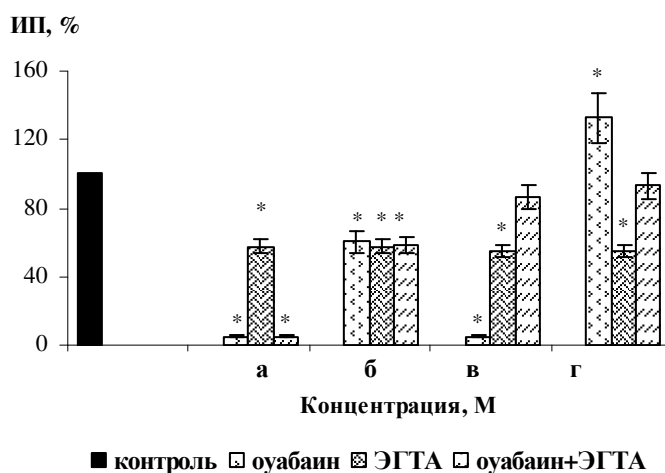


Рис. 2. Сочетанное влияние оубаина и ЭГТА ($1 \cdot 10^{-3}$ М) на рост эксплантатов ткани печени (а, б) и сердца (в, г)
 а – оубаин ($1 \cdot 10^{-6}$ М),
 б – оубаин ($1 \cdot 10^{-7}$ М),
 в – оубаин ($1 \cdot 10^{-8}$ М),
 г – оубаин ($1 \cdot 10^{-10}$ М).

5. Исследование влияния коеновой кислоты на ткань печени и сердца 10-12-дневных куриных эмбрионов в органотипической культуре

Производная гамма-пирона – коеновая кислота является действующей субстанцией анальгетического препарата «Аноцептин» (Лопатина, 2008; Лопатина и др.,

2008в). Регуляция коеновой кислотой сигнальной функции Na^+, K^+ -АТФазы при передаче сигнала в системе опиоидоподобный рецептор $\rightarrow \text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФаза $\rightarrow \text{Na}_v1.8$ -канал (Крылов и др., 1999) в мембране сенсорного нейрона позволила предположить, что она может обладать трофическими свойствами. Рост эксплантатов ткани печени при введении в культуральную среду коеновой кислоты в широком диапазоне концентраций ($1 \cdot 10^{-4}$ - $1 \cdot 10^{-11}$ М) не отличался от роста эксплантатов контрольной серии. Гистологических отличий от контрольных эксплантатов также не обнаружено.

Влияние коеновой кислоты на рост эксплантатов ткани сердца было изучено в диапазоне концентраций от $1 \cdot 10^{-6}$ до $1 \cdot 10^{-8}$ М. Выраженный стимулирующий эффект обнаружили при добавлении в питательную среду коеновой кислоты в концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ М. ИП эксплантатов превышал контрольные значения ($n=24$) на $35 \pm 3\%$ ($n=25$, $p < 0.05$). Гистологические исследования показали, что зона роста была представлена кардиомиоцитами. В концентрациях $1 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-8}$ М достоверных отличий в величине ИП экспериментальных и контрольных эксплантатов обнаружено не было.

Полученные результаты свидетельствуют, что в регуляции роста ткани сердца в эмбриональный период онтогенеза участвует Na^+, K^+ -АТФаза в качестве трансдуктора сигнала. Тот факт, что в мембране кардиомиоцитов в этот период развития преобладает $\alpha 3$ -изоформа Na^+, K^+ -АТФазы, которой нет в гепатоцитах печени, позволяет предположить, что сигнальная функция фермента в клетках сердца обусловлена активностью именно этой изоформы.

6. Механизм действия коеновой кислоты на ткань сердца 10-12-дневных куриных эмбрионов

Для экспериментальной проверки гипотезы о возможности коеновой кислоты модулировать трансдукторную функцию Na^+, K^+ -АТФазы исследовали сочетанное действие коеновой кислоты и специфического лиганда Na^+, K^+ -АТФазы оуабаина. Одновременное добавление в питательную среду оуабаина в концентрации полностью блокирующей рост эксплантатов ткани сердца ($1 \cdot 10^{-8}$ М) и коеновой кислоты ($1 \cdot 10^{-6}$ М), стимулирующей рост ткани сердца приводило к снятию ингибирующего влияния оуабаина. ИП экспериментальных эксплантатов практически не отличался от контроля.

Результаты по исследованию действия сердечных гликозидов и коеновой кислоты на рост эксплантатов ткани сердца позволяют заключить, что существуют две возможности модуляции трансдукторной функции Na^+, K^+ -АТФазы: 1. трансдуктор-опосредованная (в этом случае фермент выступает в качестве модулированного рецептора к сердечным гликозидам и трансдуктора сигнала); 2. рецептор-опосредованная, лигандом в этом случае служит коеновая кислота, а Na^+, K^+ -АТФаза играет роль трансдуктора.

7. Оценка состояния антитоксической функции печени взрослых крыс в условиях хронического 90-дневного внутривенного введения препарата «Аноцептин»

Поскольку в опытах с помощью метода органотипической культуры было обнаружено, что коеновая кислота не влияет на рост эксплантатов ткани печени 10-12-дневных куриных эмбрионов, было выдвинуто предположение, что препарат «Аноцептин», изготовленный на ее основе не должен оказывать токсического воздействия на печень. Исследование токсических свойств препарата в отношении печени проводили на взрослых крысах в условиях гексеналового сна. Лекарственная форма препарата «Аноцептин» представляет собой 1- и 2%-ный раствор для внутривенных инъекций. Каждая ампула содержит 10 или 20 мг действующей субстанции – коеновой кислоты.

Препарат в дозе 5 мг/кг (в пересчете на действующую субстанцию) не вызывал изменения продолжительности наркотического сна сразу после инъекции аноцептина, а также на 30-й и 90-й дни эксперимента. Ежедневное введение аноцептина в хвостовую вену крыс в дозе 100 мг/кг также не влияло на длительность гексеналового сна в фоне, на 30-й и 90-й дни от начала исследования. Аналогичные результаты были получены при действии препарата в дозе 300 мг/кг (табл. 1).

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что коеновая кислота и препарат, разработанный на ее основе, при ежедневном внутривенном введении в течение 90 дней не оказывают негативного влияния на состояние ткани печени и антитоксическую функцию микросомальных ферментов гепатоцитов печени.

Таблица 1. Влияние препарата «Аноцептин» на продолжительность гексеналового сна у белых крыс (мин, $M \pm m$)

| Сроки исследования (дни) | Экспериментальная группа и пол | | | | | | | |
|--------------------------|--------------------------------|--------------|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | Контроль | | Аноцептин, мг/кг | | | | | |
| | М | F | 5 | | 100 | | 300 | |
| М | | | F | М | F | М | F | |
| Фон | 28.1 ±1.6 | 27.2 ±2.3 | 26.2 ±2.4 | 25.6 ±1.8 | 32.2 ±2.5 | 28.6 ±1.7 | 31.3 ±3.2 | 27.2 ±2.7 |
| 30 день | 30.1 ±1.7 | 29.4 ±2.3 | 25.2 ±2.0 | 27.1 ±2.3 | 28.2 ±1.3 | 26.5 ±1.9 | 27.9 ±1.5 | 25.1 ±1.7 |
| 90 день | 26.1 ±2.4 | 31.3 ±3.2 | 28.8 ±2.5 | 29.0 ±2.1 | 28.4 ±1.8 | 29.0 ±1.1 | 29.6 ±1.3 | 28.8 ±1.4 |
| Количество животных | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |

М-самцы, F-самки.

8. Влияние хронического 90-дневного внутривенного введения аноцептина на параметры систолического давления и активный транспорт ионов Na^+ , K^+ -АТФазой клеток миокарда взрослой крысы в системных экспериментах

На фоне развивающегося болевого синдрома различной этиологии наблюдается повышение артериального давления. Для того чтобы оценить безопасность применения препарата «Аноцептин», в отдельной серии экспериментов исследовали его действие на параметры систолического давления. Обнаружено, что систолическое давление в группе контрольных животных не изменялось на протяжении 90 дней исследования и составило 113.0 ± 7.4 и 115.0 ± 7.4 мм рт.ст. у самцов и самок, соответственно. Ежедневное внутривенное введение аноцептина взрослым крысам обоего пола в дозах 5 и 100 мг/кг (в пересчете на действующую субстанцию) в течение 90 дней не влияло на величину систолического давления. Данные, полученные в экспериментальных группах непосредственно после введения препарата, на 30-й и 90-й дни исследования не отличались от контроля. Хроническое введение аноцептина в дозе 300 мг/кг достоверно снижало уровень давления на 90-й день исследования в среднем на 13% и составило 98.0 ± 6.6 (самцы) и 97.0 ± 6.3 (самки) мм рт. ст.

Изменение насосной функции Na^+ , K^+ -АТФазы кардиомиоцитов вызывает нарушение трансмембранного распределения потенциалобразующих ионов, что отражается на процессе электрогенеза клеток проводящей системы сердца и рабочего миокарда. Электрические свойства миокарда оценивают с помощью метода электрокардиографии (Хабриев, 2005).

Ежедневное внутривенное введение аноцептина взрослым крысам обоего пола в дозе 5 мг/кг в течение 90 дней не влияло на параметры ЭКГ (табл. 2) при измерении этих показателей сразу после первой инъекции, на 30-й и 90-й дни исследования. При 90-дневном введении препарата в дозе 100 мкг/кг показатели ЭКГ не отличались от показателей интактных животных. Хроническое введение препарата в дозе 300 мкг/кг не оказывало влияния на состояние электрических процессов в миокарде в фоне, на 30-й и 90-й дни эксперимента (табл. 2).

Отсутствие изменений параметров ЭКГ в условиях хронического 90-дневного внутривенного введения аноцептина однозначно свидетельствует о том, что действие исследуемого препарата не затрагивает насосную функцию Na^+ , K^+ -АТФазы.

Таблица 2. Влияние препарата «Аноцептин» на ЧСС и параметры ЭКГ крыс (M±m). M-самцы, F-самки.

| Показатель | Исследуемые группы пол и количество животных | | | | | | | |
|-------------|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | Контроль | | 5 мг/кг | | 100 мг/кг | | 300 мг/кг | |
| | M(n=20) | F(n=20) | M(n=20) | F(n=20) | M(n=20) | F(n=20) | M(n=20) | F(n=20) |
| Фон | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| ЧСС, уд/мин | 406±8 | 419±15 | 501±21 | 464±32 | 461±26 | 479±32 | 483±33 | 436±28 |
| P, мВ | 0.09±0.02 | 0.10±0.02 | 0.09±0.01 | 0.10±0.01 | 0.08±0.01 | 0.09±0.02 | 0.09±0.01 | 0.09±0.01 |
| R, мВ | 0.55±0.16 | 0.63±0.12 | 0.56±0.11 | 0.61±0.10 | 0.62±8.85 | 0.64±0.14 | 0.61±0.11 | 0.61±0.10 |
| S, мВ | 4.09±0.86 | 3.02±0.95 | 6.98±0.55 | 2.99±0.38 | 3.95±0.90 | 2.90±0.30 | 3.03±0.29 | 5.03±0.31 |
| T, мВ | 0.14±0.01 | 0.18±0.02 | 0.11±0.02 | 0.17±0.03 | 0.14±0.03 | 0.18±0.03 | 0.15±0.01 | 0.13±0.02 |
| PQ, мс | 45.9±0.9 | 49.6±1.1 | 43.0±2.1 | 46.3±2.1 | 44.5±1.0 | 44.9±2.0 | 48.2±1.4 | 44.9±1.5 |
| QT, мс | 52.5±2.1 | 54.2±2.9 | 56.6±3.0 | 55.8±1.1 | 57.8±3.0 | 61.3±3.1 | 59.5±2.5 | 61.8±2.5 |
| 30 дней | | | | | | | | |
| ЧСС, уд/мин | 428±22 | 439±15 | 477±24 | 509±12 | 506±5 | 501±12 | 459±17 | 542±24 |
| P, мВ | 0.11±0.01 | 0.08±0.02 | 0.10±0.02 | 0.10±0.01 | 0.09±0.01 | 0.10±0.02 | 0.08±0.01 | 0.09±0.01 |
| R, мВ | 0.60±0.07 | 0.62±0.09 | 0.57±0.11 | 0.60±0.12 | 0.62±0.11 | 0.63±0.10 | 0.60±0.09 | 0.62±0.12 |
| S, мВ | 4.01±1.19 | 10.0±1.05 | 4.98±0.73 | 3.80±0.29 | 2.95±0.30 | 3.90±0.43 | 4.16±0.24 | 4.81±0.42 |
| T, мВ | 0.17±0.01 | 0.18±0.04 | 0.14±0.03 | 0.16±0.03 | 0.15±0.04 | 0.17±0.03 | 0.17±0.02 | 0.15±0.02 |
| PQ, мс | 47.8±1.0 | 44.9±1.1 | 43.5±1.1 | 47.2±1.1 | 47.2±2.1 | 45.9±2.2 | 46.0±1.9 | 45.8±1.7 |
| QT, мс | 60.7±4.2 | 67.6±3.0 | 65.3±3.2 | 63.7±4.2 | 60.6±3.2 | 64.9±2.9 | 63.3±3.5 | 58.8±3.8 |
| 90 дней | | | | | | | | |
| ЧСС, уд/мин | 439±14 | 415±32 | 406±33 | 433±36 | 380±10 | 412±13 | 399±21 | 389±29 |
| P, мВ | 0.13±0.02 | 0.12±0.03 | 0.09±0.01 | 0.08±0.01 | 0.08±0.02 | 0.11±0.03 | 0.10±0.04 | 0.05±0.02 |
| R, мВ | 0.61±7.58 | 0.52±2.00 | 0.65±0.11 | 0.63±9.78 | 0.51±0.10 | 0.57±3.79 | 0.54±8.81 | 0.52±9.79 |
| S, мВ | 5.93±0.62 | 2.02±0.20 | 8.12±0.64 | 3.98±0.38 | 8.27±0.27 | 6.67±0.48 | 5.80±0.28 | 7.86±0.31 |
| T, мВ | 0.18±0.02 | 0.13±0.03 | 0.13±0.01 | 0.16±0.05 | 0.10±0.02 | 0.17±0.02 | 0.12±0.02 | 0.14±0.04 |
| PQ, мс | 40.7±1.1 | 46.0±1.0 | 42.6±1.0 | 45.6±1.0 | 48.1±1.0 | 51.0±0.9 | 45.3±0.9 | 46.4±0.9 |
| QT, мс | 58.4±1.9 | 63.0±4.0 | 59.4±2.1 | 60.0±4.8 | 59.7±2.0 | 64.3±2.0 | 59.6±1.9 | 64.9±3.4 |

ВЫВОДЫ

1. Впервые обнаружено, что действие оуабаина, дигоксина и строфантина К на регуляцию роста ткани печени и сердца носит дозозависимый и тканеспецифичный характер. Препараты угнетают рост ткани печени и модулируют рост эксплантатов ткани сердца.
2. Теоретические расчеты показали, что оуабаин хелатирует ионы кальция. Разнонаправленные эффекты оуабаина при регуляции пролиферации кардиомиоцитов устраняет ЭГТА (10^{-3} М), что свидетельствует о том, что модуляцию сигнальной функции Na^+, K^+ -АТФазы кардиомиоцитов может осуществлять хелатный комплекс оуабаин- Ca^{2+} .
3. Экспериментально доказано, что Na^+, K^+ -АТФаза гепатоцитов не участвует в модуляции их пролиферации в качестве трансдуктора. Физиологическая роль эндогенного оуабаина заключается в трансдуктор-опосредованной модуляции Na^+, K^+ -АТФазы эмбриональных кардиомиоцитов. Гликозид полностью ингибирует деление

кардиомиоцитов в концентрации 10^{-8} М и на 33% достоверно стимулирует пролиферацию кардиомиоцитов в дозе 10^{-10} М.

4. Оуабегенин угнетает рост эксплантатов ткани печени и сердца в более высоких концентрациях, чем сердечные гликозиды, имеющие остатки сахаров. Действие оуабегенина не является тканеспецифичным. Отсутствие углеводного компонента в молекуле гликозида приводит к утрате его способности регулировать трансдукторную функцию Na^+, K^+ -АТФазы, но сохраняет возможность влиять на насосную функцию фермента.
5. Коленовая кислота не влияет на рост эксплантатов ткани печени 10-12-дневных куриных эмбрионов. Аноцептин (5, 100, 300 мг/кг в пересчете на действующую субстанцию коленовую кислоту) в условиях хронического внутривенного 90-дневного введения не оказывает негативного влияния на состояние ткани печени и ее антиоксидантную функцию.
6. Коленовая кислота в концентрации 10^{-6} М стимулирует рост эксплантатов ткани сердца 10-12-дневных куриных эмбрионов на 38%. Эффект обусловлен ее модулирующим влиянием на трансдукторную функцию Na^+, K^+ -АТФазы кардиомиоцитов. Отсутствие изменений параметров ЭКГ в условиях хронического 90-дневного внутривенного введения аноцептина (5, 100, 300 мг/кг в пересчете на коленовую кислоту) свидетельствует о том, что исследуемый препарат не влияет на электрогенную функцию Na^+, K^+ -АТФазы кардиомиоцитов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кипенко А.В., Лобов Г.И., Крылов Б.В. Влияние дигоксина на рост ткани печени в органотипической культуре // Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова. – 2006. – № 3. – С. 194-196.
2. Кипенко А.В. Влияние дигоксина на рост ткани печени в органотипической культуре // VI Всероссийская университетская научно-практическая конференция молодых ученых и студентов по медицине. – Тула, 2007. – С. 114-115.
3. Кипенко А.В., Пенниайнен В.А. Участие Na^+, K^+ -АТФазы в регуляции роста ткани печени в органотипической культуре // Материалы всероссийского форума студентов, аспирантов и молодых ученых «Наука и инновации в технических университетах». – Санкт-Петербург, 10-12 октября, 2007. – С. 177.
4. Kipenko A.V., Penniyaunen V.A. Role of ouabain in regulation growth of difference tissue // Technologies of the 21st century: biological, physical, informational and social aspects: The 2nd St.-Petersburg Humboldt-kolleg conference. – St.-Petersburg, Oktober 7-8, 2008. – P. 14-15.

5. Кипенко А.В., Пенниййнен В.А., Лопатина Е.В. О возможности образования хелатного комплекса оуабаин- Ca^{2+} // Материалы второго всероссийского форума студентов, аспирантов и молодых ученых «Наука и инновации в технических университетах». – Санкт-Петербург, 28-31 октября, 2008. – С. 172-173.
6. Кипенко А.В., Пенниййнен В.А., Лопатина Е.В. Влияние сердечных гликозидов на рост эксплантатов ткани печени // Научные труды II съезда физиологов СНГ. – Кишинэу (Молдова), 29-31 октября, 2008. – С. 39-40.
7. Кипенко А.В., Пенниййнен В.А., Лопатина Е.В. Роль Na^+ , K^+ -АТФазы в регуляции роста тканей разных типов // Материалы конференций политехнического симпозиума «Молодые ученые – промышленности северо-западного региона». – Санкт-Петербург, 9 декабря, 2008. – С. 118-119.
8. Лопатина Е.В., Пенниййнен В.А., Плахова В.Б., Подзорова С.А., Кипенко А.В., Крылов Б.В., Цырлин В.А. Физиологическая роль сигнальной функции Na^+ , K^+ -АТФазы // Научные труды II съезда физиологов СНГ. – Кишинэу (Молдова), 29-31 октября, 2008. – С. 56.
9. Кипенко А.В., Пенниййнен В.А., Лопатина Е.В., Рогачевский И.В., Цырлин В.А., Крылов Б.В. Роль оуабаина в регуляции роста тканей разных типов // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2009. – Т. 95. – № 2. – С. 137-142.
10. Кипенко А.В., Пенниййнен В.А., Лопатина Е.В. Исследование действия коеновой кислоты на состояние сердечно-сосудистой системы теплокровных животных // Материалы конференций политехнического симпозиума «Молодые ученые – промышленности северо-западного региона». – Санкт-Петербург, 22 мая, 2009. – С. 166-167.
11. Кипенко А.В., Пенниййнен В.А., Лопатина Е.В., Крылов Б.В. Оценка действия препарата аноцептин на ткань печени и ее детоксицирующую функцию // Седьмая международная научно-практическая конференция «Исследование, разработка и применение высоких технологий в промышленности» [Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования, образование]. – Санкт-Петербург, 28-30 апреля, 2009. – Т. 17. – С. 19.
12. Лопатина Е.В., Пенниййнен В.А., Кипенко А.В., Цырлин В.А. Физиологическое значение рамнозильного остатка в молекулах сердечных гликозидов // VII Всероссийская конференция с международным участием «Механизмы функционирования висцеральных систем». – Санкт-Петербург, 29 сентября–02 октября, 2009. – С. 250-251.